



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
BACHARELADO EM FARMÁCIA**

**RAQUEL MARIA VIEIRA RAMOS**

**CONTROLE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DAS FOLHAS DE *Morus nigra* E DO  
EXTRATO ETANÓLICO.**

**Brasília – DF  
2022**

**RAQUEL MARIA VIEIRA RAMOS**

**CONTROLE DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DAS FOLHAS DE *Morus nigra* E DO  
EXTRATO ETANÓLICO.**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado à Faculdade de Ciências em  
Saúde da Universidade de Brasília, com o  
requisito para o título de Bacharel em  
Farmácia.

Orientador (a): Profa. Dra. Paula Monteiro de Souza

Coorientador (a): Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

**Brasília – DF  
2022**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus que me deu as oportunidades.

À minha família, principalmente aos meus pais, Irene e Eduardo, meu avô, Luiz, por todo o apoio e compreensão.

À Professora Pérola e à Professora Paula, que me deram a oportunidade de ser orientada por elas, pela confiança e por cederem o laboratório, os materiais e tempo delas para que eu pudesse concretizar este trabalho.

Ao doutorando Artur F. Borges Arantes do laboratório de Produtos Naturais e de Controle Qualidade, que fez as coletas das folhas, me ensinou e acompanhou no desenvolvimento das minhas atividades no laboratório e por todo apoio e disposição. Obrigada!

Aos colegas de laboratório pelos ensinamentos e disposição em me ajudar e orientar.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública (Lacen) do Distrito Federal, pelos meios de culturas utilizados durante os experimentos.

À Universidade de Brasília por me propiciar a oportunidade de cursar um ensino superior público.

À analista do Instituto de Biologia, Lilian, por ter me fornecido os sais biliares e o vermelho neutro para o preparo do Ágar violeta vermelho neutro glicose. Obrigada!

Aos meus colegas Pedro Victor e Nicolý Luiza por todo o apoio dado por eles.

## RESUMO

O controle de qualidade é um conjunto de medidas tomadas na produção de lotes de medicamentos e demais produtos, que satisfaçam às normas de identidade, atividade, teor, pureza, eficácia e inocuidade de acordo com a Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. Dentre os medicamentos, temos os fitoterápicos que são as matérias-primas ativas vegetais e que não possuem substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais e nem associações com extratos vegetais. Já a OMS, define os fitoterápicos como ervas e/ou materiais fitoterápicos e/ou ervas preparações e/ou produtos à base de plantas acabados em uma forma adequada para administração a pacientes. Logo, os fitoterápicos e as drogas vegetais são medicamentos e precisam passar por um controle de qualidade adequado durante as etapas do processo de produção. As folhas da *Morus nigra* são bastantes conhecidas por possuírem benefícios farmacológicos de amplo espectro como atividades antidiabéticas, antinociceptivas, anticancerígenas e hepatoprotetoras. Desse modo, o trabalho de conclusão de curso teve como objetivo analisar a qualidade microbiológica da droga vegetal, as folhas. Foram realizados os testes microbiológicos: contagem de microrganismos mesófilos e de patógenos (bactérias gram-negativas bile tolerantes, *Escherichia coli* e *Salmonella*). Neste estudo foi observado crescimento de bactérias mesófilas, acima do limite, e presença de patógenos, *E. coli*. Logo, a droga vegetal não apresentou qualidade sanitária dentro da esperada para aprovação de seu uso.

**Palavras-chave:** *Morus nigra*, controle de qualidade microbiológica, droga vegetal

## ABSTRACT

Quality control is a set of measures taken in the production of batches of medicines and other products, which meet the standards of identity, activity, content, purity, efficacy, and harmlessness according to the Brazilian Pharmacopoeia, 6<sup>th</sup> edition. Among the medicines, we have the phytotherapies that are the active plant raw materials and that do not have isolated, synthetic, or natural active substances or associations with plant extracts. The WHO, on the other hand, defines herbal medicines as herbs and/or herbal materials and/or herbal preparations and/or products herbal products finished in a form suitable for administration to patients. Therefore, herbal medicines and their plant drugs are medicines and need to undergo adequate quality control during the stages of the production process. *Morus nigra* leaves are well known for having broad-spectrum pharmacological benefits such as antidiabetic, antinociceptive, anticancer, and hepatoprotective activities. Thus, the course conclusion work aims to analyze the microbiological quality of the plant drug, the leaves. Microbiological tests were conducted for counting microorganisms' mesophiles and pathogens (bile tolerant Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella*). In this study, the growth of mesophilic bacteria was observed, above the limits, and the presence of pathogens, *E. coli*. Therefore, the herbal drug did not present sanitary quality within the expected approval of its use.

**Keywords:** *Morus nigra*, microbiological quality control, herbal drug

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A árvore de amoreira. (A) Árvore de amoreira na visão de quem passa pela calçada. (B) Árvore de amoreira na visão de quem vê pela rua. ....	12
Figura 2 - Exsicata de <i>M. nigra</i> . ....	12
Figura 3 - Flores e Frutos de <i>M. nigra</i> . Fonte: Gonçalves et al. (2007) (10) .....	13
Figura 4 - Cromatografia de camada delgada dos extratos de <i>Morus nigra</i> . Eluente: Acetato de Etila, Álcool Metílico, Água, Ácido Fórmico (20 : 2,7 : 2,0 : 0,2). Revelador: NP-PEG. (A). Extrato etanólico A; (B) Extrato etanólico B; (2) Padrão de rutina; (3) Padrão de isoquercitrina; .....	22
Figura 5 - Crescimentos de microrganismos mesófilos em folhas pulverizadas de <i>Morus nigra</i> em meio ágar Sabouraud após 7 dias a 25 °C. ....	23
Figura 6 - Crescimentos de microrganismos mesófilos em folhas pulverizadas de <i>Morus nigra</i> em meio ágar caseína-soja após 7 dias a 32 °C. ....	23
Figura 7 - Crescimentos de <i>E.coli</i> em folhas pulverizadas de <i>Morus nigra</i> em meio ágar <i>MacConkey</i> , após 24 horas de incubação do caldo <i>MacConkey</i> com as folhas pulverizadas, na diluição 1:10. ....	24
Figura 8 - Crescimentos de <i>E. coli</i> em folhas pulverizadas de <i>Morus nigra</i> em meio ágar <i>MacConkey</i> , após 24 horas de incubação do caldo <i>MacConkey</i> com folhas pulverizadas, na diluição 1:1.000. ....	24
Figura 9 - Folhas pulverizadas nos meios para identificação de <i>Salmonella</i> . (A) meio ágar eosina-azul de metileno (EMB); (B) meio <i>Salmonella Shigella</i> ; (C) meio ágar xilose lisina desoxicolato; (D) meio cromogênico para <i>Salmonella</i> . ....	25
Figura 10 - Placa de Referência. (A) <i>E. coli</i> ATCC na placa de Eosina Azul Metileno (EMB); (B) <i>Salmonella</i> no meio ágar eosina-azul de metileno EMB; (C) <i>Salmonella</i> ATCC. Ágar XLD – morfologia colonial de <i>Salmonella</i> spp; (D) <i>Salmonella</i> spp. Ágar <i>Salmonella-Shigella</i> (Ágar SS); (E) Meio cromogênico para <i>Salmonella</i> ; Fonte: DIVYA, P. S. et al (2016) e Ministério da Saúde (2011) e EIGNER et al (2001). ....	26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Interpretação dos resultados do teste quantitativo para bactérias gram-negativas bile tolerantes. Fonte: Farmacopeia Brasileira 6ª edição, 2019.....	20
Tabela 2 - Valores do Fator de Retenção (Rf) calculados para os extratos etanólicos de <i>M. nigra</i> revelados com NP-PEG .....	21
Tabela 3 - Tabela dos resultados quantitativos para bactérias gram-negativas bile tolerantes.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplado ao detector por Espectrometria de Massa
DDA	Doenças Diarreicas Agudas
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
IN	Instrução Normativa
MS	Ministério da Saúde
NP-PEG	<i>Natural Product</i> – Polietilenoglicol
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Proteína C reativa
POP's	Procedimentos Operacionais Padrões
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PTF	Produtos Tradicionais Fitoterápicos
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rf	Fator de Retenção
SDA	Ágar Sabouraud Dextrose
TSA	<i>Tryptic Soy Ágar</i> (Ágar Caseína-soja)
UV	Ultravioleta
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
VIS	Visível

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	7
1.1. A indústria farmacêutica .....	7
1.2. Controle de qualidade .....	8
1.3. Microrganismos patógenos .....	9
1.4. Legislação atual .....	10
1.5. <i>Morus nigra</i> .....	11
2. Objetivos .....	15
3. Materiais e métodos .....	16
3.1. Materiais e Preparo de Soluções.....	16
3.2. Preparo do extrato etanólico de <i>Morus nigra</i> .....	16
3.2.1. Obtenção do material botânico .....	16
3.2.2. Obtenção do extrato etanólico das folhas e identificação através de CCD.....	17
3.3. Controle de qualidade microbiológico.....	18
3.3.1. Contagem de número total de microrganismos mesófilos.....	18
3.3.2. Pesquisa de <i>E. coli</i> .....	18
3.3.3. Pesquisa de <i>Samonella</i> spp.....	19
3.3.4. Pesquisa de Bactérias gram-negativas bile tolerantes .....	19
4. Resultados.....	21
4.1. Identificação através dos compostos fitoquímicos majoritários presentes no extrato etanólico das folhas de <i>M. nigra</i> .....	21
4.2. Controle de qualidade microbiológico.....	22
4.2.1. Contagem de número total de microrganismos mesófilos.....	22
4.2.2. Pesquisa de <i>E. coli</i> .....	23
4.2.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	24
4.2.4. Pesquisa de Bactérias gram-negativas bile tolerantes .....	26
5. Conclusões.....	29
Referências .....	30

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A indústria farmacêutica

A indústria farmacêutica contribui substancialmente para o bem-estar da população mundial, sendo os pontos principais: o aumento na expectativa de vida, que aumentou em até 20 anos e a diminuição no tempo de internações em hospitais. É importante citar também que a indústria farmacêutica possui extrema importância na economia mundial (18).

Durante sua história, a indústria farmacêutica acompanhou as inúmeras transformações do processo de produção industrial. De maneira paralela, a indústria alimentícia também se aperfeiçoava e desenvolvia seu controle de qualidade por consequência dos inúmeros casos de contaminações por patógenos nos seus consumidores que acabavam apresentando doenças como: Doenças Diarreicas Agudas (DDA) e botulismo. Anos depois, a indústria farmacêutica sofreria dos mesmos problemas em relação ao controle de qualidade na produção de seus medicamentos com consequências diferentes, pois muitas vezes se tratava de pacientes debilitados (2,32,29).

As regulamentações para o controle de qualidade na indústria farmacêutica não acompanharam as modernizações vividas por outras indústrias, entretanto seguiram criando seu próprio controle de qualidade através de respostas aos incidentes fatais. Historicamente, os estudos relacionados ao controle de qualidade para novos medicamentos surgiram nos Estados Unidos a partir de 1938 após um elixir de sulfanilamida estar contaminado por estreptococos e ter causado mais de 100 vítimas. Logo após o incidente, foi sugerido regulamentações mais rigorosas que forneceria a otimização e a padronização na qualidade dos medicamentos (18).

Os regulamentos terem sido implementados para garantir a diminuição de vítimas por contaminações em razão do uso de medicamentos contaminados refletiu em como a indústria se comportaria. A indústria farmacêutica mostrou que os incidentes de fatalidades influenciaram em suas escolhas como: ações de transformação de seus ambientes em lugares altamente regulamentados e confiança na exclusividade da marca sobre medicamentos para obtenção de lucros.

No Brasil, a partir da década de 1990, devido ao alto custo de produção de medicamentos sintetizados e à descoberta dos fitocomplexos, iniciou-se um movimento de valorização do uso tradicional de plantas medicinais e o desenvolvimento de fitoterápicos.

Embora o uso de plantas medicinais já ocorresse na medicina popular, só recentemente a área farmacêutica voltou sua atenção para a regulamentação na área de fitoterápicos (33).

Esse processo de valorização foi fortalecido no Brasil com a implantação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) que visa promover ações, principalmente voltadas ao Sistema Único de Saúde (SUS), voltadas para o uso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos. Instrumentos legais específicos também foram criados, além de estabelecer os requisitos mínimos para seu registro. O uso de plantas medicinais representa, em várias comunidades brasileiras, o papel de único recurso terapêutico, acreditando que essa prática seja benéfica à saúde, desde que o usuário tenha conhecimento prévio de sua finalidade, riscos e benefícios (33).

Sendo assim, existem muitos desafios sobre o tema, desde o financeiro à interesse de estudos, pois existem áreas pouco exploradas na indústria farmacêutica, que é o caso dos fitoterápicos, plantas medicinais e drogas vegetais que além de ser um assunto contemporâneo, existe um espaço ilimitado para pesquisas (18).

## **1.2. Controle de qualidade**

O conceito de controle de qualidade é um conjunto de garantias na produção de lotes de medicamentos e demais produtos, que satisfaçam às normas de identidade, atividade, teor, pureza, eficácia e inocuidade. Estes parâmetros são assegurados através dos variados ensaios dentro do controle de qualidade físico-químico e microbiológico (12,15).

O interesse farmacêutico por questões fitoterápicas e plantas medicinais, mostrou que é preciso garantir um controle de qualidade nos produtos, pois é necessário saber a procedência das plantas medicinais utilizadas nos fitoterápicos para que a partir disso o processo de contaminação, não só microbiológico, mas químico, possa ocorrer sem desvios na qualidade e que não traga danos aos seus consumidores (34).

Deve ser levado em conta durante o controle microbiológico, que as plantas cultivadas para a produção de fitoterápicos estão em exposição a fatores ambientais como: a poluição na água de irrigação e atmosfera, condições de coleta, manipulação, secagem e armazenagem, sendo questões a serem consideradas no controle de produtos naturais, pois tudo isso permite altos níveis de contaminação microbiana (34).

Nos testes físico-químicos são, normalmente, feitos para minimizar erros de dosagens dos medicamentos, pureza da matéria-prima e inativação de princípios ativos, e os testes microbiológicos são feitos controles de contaminação de patógenos. Ambos são partes integrantes dos procedimentos operacionais padrões, POP's, dentro das empresas.

Os processos de controle da qualidade são feitos para propiciar a otimização na produção dos medicamentos, a padronização de procedimentos, a garantia da qualificação profissional, a modernização dos equipamentos, a rastreabilidade dos produtos, a redução de tempo e desperdício de matéria-prima. Dessa forma, percebe-se que a utilização de POP's (procedimentos operacionais padrões), as Boas Práticas de Fabricação descrita na RDC nº 301, 21 de agosto de 2019 da Anvisa e a utilização da Farmacopeia são essenciais para garantir a produção e padronização de um produto com alta qualidade (1,2).

### 1.3. Microrganismos patógenos

Com base na Farmacopeia Brasileira e na OMS, os testes microbiológicos devem seguir parâmetros em relação ao controle de qualidade de drogas vegetais, que não será submetida a pré-tratamento que reduz a carga microbiana, como: ausência de *Salmonella*, *Escherichia coli* e Bactérias Gram-negativas bile tolerantes, sendo o último citado apenas permitido até  $10^3$  em 1 g de amostra (12,15).

A seguir uma descrição breve sobre os microrganismos:

1. Bactérias Gram-negativas bile tolerantes – Por não se tratar de um patógeno específico, o teste avalia um grupo de microrganismos que abrange uma variedade de espécies de bactérias. A Farmacopeia Brasileira indica que os microrganismos de importância na avaliação da qualidade são os da família *Enterobacteriaceae*. Esta família é uma das mais importantes porque estão associadas à deterioração de alimentos e indicadores da qualidade da água. É constituída de um grande grupo de bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas, nas quais estão incluídos importantes patógenos causadores de doenças de origem alimentar, como *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica* e bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Cronobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*. A ausência destas bactérias nos alimentos proporciona uma garantia de que a higiene e o processamento do alimento foram realizados apropriadamente, enquanto o inverso indica um potencial problema ou falha no processo (14).
2. Espécies de *Salmonella* – bastonete Gram-negativo, flagelado, anaeróbio facultativo e intracelular, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. As bactérias desta espécie são tipicamente adquiridas por via oral, sendo comumente isoladas de vegetais e frutas frescas (14). A manifestação clínica da infecção por *Salmonella* (salmonelose), se encontra dentro das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), podendo ser dividida em dois tipos de doenças: febre tifoide e Salmonelose não tifoide (16). Os sintomas mais comuns entre as duas doenças são: vômito, dores abdominais, febre e diarreia. Entretanto, na febre tifoide os sintomas são mais graves e com uma taxa de mortalidade

maior em relação à salmonelose não tifoide. Além disso, o indivíduo infectado também pode se tornar um portador crônico, carregando o microrganismo de forma assintomática, mas sendo uma fonte de transmissão. Casos de infecção crônica são preocupantes, principalmente quando o indivíduo trabalha no setor alimentício, podendo assim contaminar os alimentos e transmitir o patógeno. A nível mundial, as espécies de *Salmonella* causam mais de um bilhão de casos de gastroenterite e três milhões de mortes anualmente (14).

3. *Escherichia coli* – bastonete Gram-negativo, flagelado e anaeróbio facultativo, também pertencente à família *Enterobacteriaceae*. É uma bactéria comensal, tipicamente encontrada na microbiota intestinal de animais, incluindo o homem. Entretanto, nem todas as cepas são inofensivas, sendo as patogênicas capazes de causar doenças debilitantes em tecidos intestinais e extra intestinais, como gastroenterite, intoxicação alimentar, infecções nos trato urinários e respiratórios, podendo levar ao óbito (14). Por fazer parte da microbiota intestinal, a *E. coli* é usada como indicador de contaminação fecal. Durante o controle de qualidade, a sua identificação em água e alimentos indica a baixa qualidade (14).

#### 1.4. Legislação atual

Os medicamentos fitoterápicos são regulamentados no Brasil pela resolução - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 pela Anvisa, que prevê tanto a regulamentação, quanto o registro de Medicamentos Fitoterápicos e notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos (PTF). Neste documento, eles indicam que os produtos fitoterápicos e sua droga vegetal devem passar pelo controle de qualidade e apresentar laudos para comprovar.

Em monografias do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 2ª edição, não existem informações sobre o gênero *Morus*, sendo a última vez citada na Farmacopeia Brasileira, 1ª edição, por seu fruto composto e pelo seu emprego oficial é descrito como suco de amora. Mas, é possível encontrar a espécie de *Morus* sp. nas 71 espécies vegetais na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Rennisus) de 2009, que tem por finalidade fortalecer as pesquisas de espécies de plantas nativas brasileiras para contribuir com a assistência farmacêutica melhorando a eficácia e segurança dos produtos fitoterápicos usados na atenção básica em saúde (17).

Entretanto, não existe uma legislação atualmente específica para o controle de qualidade de drogas vegetais e plantas medicinais, mas a RDC nº 26/2014, a Instrução Normativa (IN) nº 04/2014 e a Farmacopeia Brasileira 6ª edição propõem ensaios para

garantir a qualidade de tais produtos. A última atualização da Anvisa sobre o tema foi a publicação de uma cartilha e um folder sobre fitoterápicos e plantas medicinais, onde explicam para a população um pouco sobre conceitos dos dois temas, suas aplicações, como notificar, onde e como procurar mais informações sobre o assunto. (30,31)

### **1.5. *Morus nigra***

A espécie *Morus nigra* é da família *Moraceae*, uma espécie bastante utilizada e cultivada por ser comestível, de fácil acesso e cultivo. A espécie tem origem vegetal da região sudoeste asiático. Com o passar do tempo, a espécie se adaptou adequadamente a regiões de zonas tropicais, subtropicais e temperadas, podendo atualmente ser encontrada em lugares como: Ásia (Coreia, Japão, China e Índia), Europa, América do Norte, América do Sul e África. No Brasil, são muito cultivadas nas regiões sul e sudeste. A sua utilização varia muito de acordo com sua localização, exemplo são os países asiáticos que cultivam as amoreiras para produção de seda na alimentação do bicho-da-seda (*Bombyx mori L.*), pois as folhas é uma fonte importante de nutrientes para o inseto. Enquanto isso, países europeus e americanos têm seus costumes voltados para alimentação, como polpas, vinagres, vinhos e produtos cosméticos. (4) Os aspectos da planta são de árvore caducifólia, geralmente dioica, de 7-12 m de altura (Figura 1).



(A)



(B)

Figura 1 - A árvore de amoreira. (A) Árvore de amoreira na visão de quem passa pela calçada. (B) Árvore de amoreira na visão de quem vê pela rua.

As folhas são simples, caráceas, glabras em ambas as faces, de 6-12 cm de comprimento, com as margens variavelmente lobadas em exemplares jovens e apenas serreadas em plantas adultas com inervações salientes e face superior luzidia (Figura 2) (5-9).



Figura 2 - Exsicata de *M. nigra*.

A inflorescência unissexual costuma se formar no período entre julho-agosto, as masculinas e as femininas em amentilhos (espigas) apresentam um comprimento variado de 3 -6 cm, sendo as masculinas levemente mais encurtadas. Seu fruto é composto, como visto na Figura 3 possui várias flores que se unem para a maturação e formam uma estrutura única comestível, com um sabor ligeiramente ácido e com fácil pigmentação. As partes desta planta que são comumente empregadas pela medicina popular são as folhas e os frutos. (4,8,9)



Figura 3 - Flores e Frutos de *M. nigra*. Fonte: Gonçalves et al. (2007) (10)

No gênero *Morus*, as espécies possuem inúmeras atividades dentre elas as mais estudadas são as atividades: antidiabética, antimicrobiana, antioxidante, imunonutritivas, anticâncer, neuroprotetora, hepatoprotetora, ansiolítica, antidepressiva e na interrupção de aterosclerose. (4)

Em estudos com a espécie de *Morus*, os resultados apresentados foram bons indicativos para atividade anti-melanogênica das folhas de *M. nigra*. A melatonina, responsável pela pigmentação da pele, é um importante mecanismo de defesa contra a radiação ultravioleta, porém quando encontrado em grandes quantidades pode causar vários problemas estéticos graves. Os inibidores de tirosinase são responsáveis por esse aumento de melanina no corpo e, por isso acabaram se tornando alvo importante para estudos e possíveis tratamentos para os distúrbios cutâneos associados à pigmentação e clareamento da pele. (21,4)

Em outros estudos feitos em camundongos, a *Morus* identificou-se o efeito antinociceptivo, o extrato da casca da raiz de *M. nigra* mostrava um prenilflavonóide chamado de morusina que agiria como um analgésico. (4)

Em estudos com o extrato etanólico de folhas de *M. alba* L. observou-se o efeito vasodilatador em ratos e coelhos, provavelmente devido à um aumento de óxido nítrico nos níveis séricos. Extratos etanólicos do caule foi possível observar atividades antibacterianas (4,19, 20).

## 2. OBJETIVOS

Objetivo geral: Avaliar a qualidade microbiológica da folha *Morus nigra*.

Para atingir este objetivo, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o perfil cromatográfico do extrato etanólico das folhas *Morus nigra*;
- Avaliar o crescimento de bactérias mesófilas, leveduras e fungos nas folhas;
- Avaliar o crescimento de patógenos (*E. coli*, *Salmonella* e bactérias gram-negativas bile tolerantes) nas folhas;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais e Preparo de Soluções

- Reagente Natural Products-Polietilenoglicol (NP-PEG) solução A  
Solução metanólica de difenilboriloxietilamina 2,0%
- Reagente Natural Products-Polietilenoglicol (NP-PEG) solução B  
Solução etanólica de polietilenoglicol-4000 (PEG) 5,0%
- Caldo Caseína-soja (HIMEDIA)
- Caldo MacConkey (KASVI)
- Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) (KASVI)
- Ágar caseína-soja (TSA) (KASVI)
- Ágar MacConkey (KASVI)
- Ágar Violeta Vermelho neutro glicose
- Ágar eosina-azul de metileno (EMB) (KASVI)
- Ágar Cromogênico para *Salmonella*
- Ágar *Salmonella Shigella*

#### 3.2. Preparo do extrato etanólico de *Morus nigra*

##### 3.2.1. Obtenção do material botânico

As folhas de *M. nigra* foram coletadas, manualmente, antes do período das chuvas do dia 5 de outubro de 2021 pelo doutorando Artur F. Borges Arantes do laboratório de Produtos Naturais e Controle Qualidade em Brasília, Distrito Federal sob as coordenadas GPS 15° 48'08.6''S 47° 56 '42.2W. A árvore foi plantada no local, porém seus cuidados em relação ao cultivo são: sem adubo ou irrigação regular, mantida em pleno sol com pouco sombreamento de outras árvores. No momento da coleta, o tempo estava ensolarado 24°C, mesmo perto da época das chuvas próximas.

### 3.2.2. Obtenção do extrato etanólico das folhas e identificação através de CCD

As folhas foram secas ao ar livre sob área coberta por 3 dias. Em seguida, as folhas secas foram levadas para uma estufa onde ficaram por mais 3 dias entre 40°C~50°C. Após o processo de secagem, as folhas foram pulverizadas com o auxílio de um moinho de facas. As folhas pulverizadas foram utilizadas para os testes microbiológicos e o extrato etanólico para identificação através de CCD.

Para obtenção do extrato etanólico, procedeu-se maceração passiva a frio, que manteve a droga, convenientemente pulverizada em álcool etílico 95% (preparado a partir de álcool etílico absoluto com adição de água destilada com auxílio de um alcoômetro). A maceração foi mantida sob agitação manual diária por dez dias consecutivos, de acordo com o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira que estipula que o período do processo de maceração deverá ser de no mínimo sete dias consecutivos (13). Para a obtenção do extrato etanólico de *M. nigra*, 210g de folhas pulverizadas foi utilizada com volume de 1050 mL de álcool etílico 95%. O processo foi realizado à temperatura ambiente e foram utilizados recipientes de vidro envolvidos em papel alumínio bem vedados, de modo a não permitir contato com a luz para evitar perdas com a luminosidade. Após o tempo de maceração a mistura foi vertida em um papel de filtro e os extratos filtrados e acondicionados em frasco âmbar. O resíduo restante no papel de filtro foi lavado aos poucos com quantidade suficiente (q.s.) do líquido extrator, álcool etílico 95%, de forma a obter o volume inicial de 1050 mL.

Os extratos foram então concentrados em rotaevaporador (Heidolph Instruments, Schwabach - Alemanha) com refrigerador acoplado (Heidolph Instruments, MX07R-20-HD2E, Schwabach - Alemanha) e bomba de vácuo (Heidolph Instruments D-91126, Schwabach - Alemanha), sob rotação de até 150 rpm à temperatura de 40°C até saída do solvente residual do extrato. Após a rotaevaporação, as amostras das folhas foram separadas em 2 tubos Falcons, foram congelados a -80°C para o processo de liofilização (liofilizador K105 Liotop, Liobras, São Carlos – SP, Brasil). O período de liofilização foi de 17 horas, obtendo-se os extratos secos das folhas de *M. nigra*.

Foi retirado duas pequenas quantidades do extrato etanólico liofilizado (Extrato A e B), e em seguida foram solubilizados em metanol 2 mL. A fase estacionária utilizada foi a placa de sílica gel com matriz de óxido de alumínio (Sigma-Aldrich, Steinheim - Alemanha). Foram feitas duas fases móveis diferentes.

A fase móvel utilizada para detecção de flavonoides e demais substâncias fenólicas foi uma mistura de Acetato de Etila, Álcool Metílico, Água, Ácido Fórmico (20 : 2,7 : 2,0 : 0,2) e para revelação foi utilizado o reagente *Natural Product* – Polietilenoglicol (NP-

PEG) (13). A revelação com NP-PEG, foram usadas duas soluções também chamadas de A (Solução metanólica de difenilboriloxietilamina) e B (Solução etanólica de polietilenoglicol-4000 (PEG), borrifada primeiro a solução A e depois foi borrifada a solução B. A cromatoplaça foi levada à uma câmara ultravioleta (Prodicil, Curitiba – PR, Brasil), onde foi visualizada sob luz ultravioleta, UV, ( $\lambda=365\text{nm}$ ). Os padrões de ácidos clorogênico, rutina e isoquercitrina foram misturados com metanol e adicionados à placa para comparação em UV.

### **3.3. Controle de qualidade microbiológico**

O controle de qualidade microbiológico foi realizado segundo a 6ª edição da Farmacopeia Brasileira (2019), de acordo com a metodologia para análise de produtos não estéreis para drogas vegetais que não serão submetidas a pré-tratamento que reduz a carga microbiana.

#### **3.3.1. Contagem de número total de microrganismos mesófilos**

As folhas pulverizadas foram pesadas 10 g e sua diluídas em série de 1:10, 1:100 e 1:1000 em tampão fosfato pH 7,2. Foi utilizado Ágar Caseína-soja para contagem do número total de bactérias e para contagem dos fungos e leveduras foi utilizado ágar *Sabouraud*. Foi inoculado 100  $\mu\text{L}$  da amostra diluída em cada placa de petri pelo método de superfície. A placa contendo ágar caseína-soja foi incubada a 35°C por 3 dias e as placas contendo ágar *Sabouraud* a 25°C por 7 dias. Após o crescimento das colônias, calculou-se o número de unidades formadoras de colônias por gramas de amostra (UFC/g). O estudo foi feito em triplicata para melhor resolução dos dados.

#### **3.3.2. Pesquisa de *E. coli***

A pesquisa do patógeno *E. coli* foi realizada adicionando 1,0 g de folhas pulverizadas em 9,0 mL de caldo caseína-soja, na qual foi incubado a 35°C por 24 h. Após esse período de incubação, 1,0 mL da amostra enriquecida foi transferida para o caldo MacConkey a 35°C por 24 h. Após o período, foi transferido 1,0 mL do caldo para ágar *MacConkey*, que também foi incubado a 35°C por 24h e, por fim, analisado a presença ou ausência de colônias. O estudo foi feito em triplicata.

A interpretação dos resultados de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição, 2019, para o meio ágar *MacConkey* seria: crescimento de colônias vermelhas, geralmente não mucosas.

### **3.3.3. Pesquisa de *Samonella* spp.**

Para o preparo de 10 g das folhas pulverizadas foi usando a diluição 1:10, como diluente foi utilizado o tampão fosfato e o caldo caseína-soja. Após a diluição a amostra foi homogeneizada e incubada durante 24 horas. Depois das 24 horas, transferiu-se 0,1 mL do conteúdo para 10 mL de caldo enriquecimento *Salmonella Rappaport Vassiliadis*. E incubou-se a 32,5°C durante 24 horas. Realizou-se a subcultura em ágar xilose lisina desoxicolato e incubou-se a 32,5°C durante 24 horas. Além deste meio foi feito uma incubação em mais meios: ágar cromogênico para *Salmonella*, que é um meio mais específico para esta bactéria, um meio ágar EMB, que seria um meio menos específico utilizado para identificação de enterobactérias, e um meio *Samonella* e *Shigella* (SS) específico para identificação de *Salmonella* e *Shigella*.

A intepretação dos resultados de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019) para o meio ágar xilose lisina desoxicolato são: presença de colônias vermelhas com ou sem centro negro que indicaria a presença de prováveis colônias de *Salmonella*.

### **3.3.4. Pesquisa de Bactérias gram-negativas bile tolerantes**

Foi preparada 1 g das folhas pulverizadas e foi diluída 1:10, como diluente o caldo caseína-soja. Foi homogeneizado e incubado a 22,5 °C por 2 horas. Foram feitos dois testes: um teste de ausência e um teste quantitativo.

No teste de ausência, o caldo caseína-soja, já diluído 1:10, foi transferido 100µL para o caldo de enriquecimento para enterobactérias *Mosssel*. Incubou-se a 32,5 °C por 24 horas. Preparou-se subculturas em placas contendo Ágar violeta vermelho neutro glicose. E incubou 32,5 °C durante 24 horas.

O teste quantitativo (seleção e subcultura): foi retirado 100 µL do caldo caseína-soja e transferido para o caldo de enriquecimento para enterobactérias *Mosssel*, de modo a obter diluições contendo 1:10, 1:100 e 1:1000. Incubou-se 32,5°C durante 24 horas. Para cada tubo positivo, realizou-se subculturas em ágar violeta vermelho neutro glicose. E os meios foram incubados a 32,5°C durante 24 horas.

Para a interpretação dos resultados positivos no meio Ágar violeta vermelho neutro glicose seria o crescimento de colônias bem desenvolvidas de bactérias Gram-negativas sendo de coloração vermelha ou avermelhadas.

Tabela 1 - Interpretação dos resultados do teste quantitativo para bactérias gram-negativas bile tolerantes. Fonte: Farmacopeia Brasileira 6ª edição, 2019.

<i>Resultados para quantidade de produto de</i>			<i>Número provável de bactérias por grama ou mililitro do produto</i>
<i>0,1 g ou 0,1 mL</i>	<i>0,01 g ou 0,01 mL</i>	<i>0,001 g ou 0,001 mL</i>	
+	+	+	Mais de $10^3$
+	+	-	Menos de $10^3$ e mais de $10^2$
+	-	-	Menos de $10^2$ e mais de 10
-	-	-	Menos de 10

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificação através dos compostos fitoquímicos majoritários presentes no extrato etanólico das folhas de *M. nigra*

Existe um mercado diverso de matérias-primas e produtos fitoterápicos que necessitam de um controle de qualidade cada vez mais atualizado, pois quanto maior o controle sobre a identificação e rastreabilidade deles, maior a segurança garantida pela empresa em seus produtos.

Para garantir a rastreabilidade e a identificação da espécie, a Cromatografia de Camada Delgada (CCD) é o método mais comum de análise por ser fácil, versátil, rápido para uma caracterização dos constituintes de uma droga vegetal. Ela foi utilizada neste trabalho para identificação da espécie *Morus nigra*. De acordo com Freitas (2015) e Lim et al (2019), os padrões escolhidos foram o ácido clorogênico, a rutina e a isoquercitrina por apresentarem maior presença em relação a outros compostos presentes na planta. O resultado presente na Figura 5 foi a presença de ácido clorogênico na eluição, sendo possível fazer o fator de retenção (Rf) e comparar com o encontrado nas amostras (Tabela 2) mostrando similaridades entre eles. As manchas vermelhas que aparecem na frente do solvente são indicativos de clorofila.

Tabela 2 - Valores do Fator de Retenção (Rf) calculados para os extratos etanólicos de *M. nigra* revelados com NP-PEG

Banda	Rf do extrato A	Rf do extrato B	Rf do Padrão
Ácido clorogênico	0,40	0,40	0,41

Para a identificação mais precisa da espécie, eram necessários combinar outras metodologias além do CCD, que seriam a identificação botânica e utilização de outras cromatografias como: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a Cromatografia Gasosa acoplado ao detector por Espectrometria de Massas (CG-MS). Essa análise é importante tanto para identificar a espécie quanto a identificação de fraudes e contaminações grosseiras que podem propiciar a degradação do material vegetal diminuindo a sua eficácia e segurança.

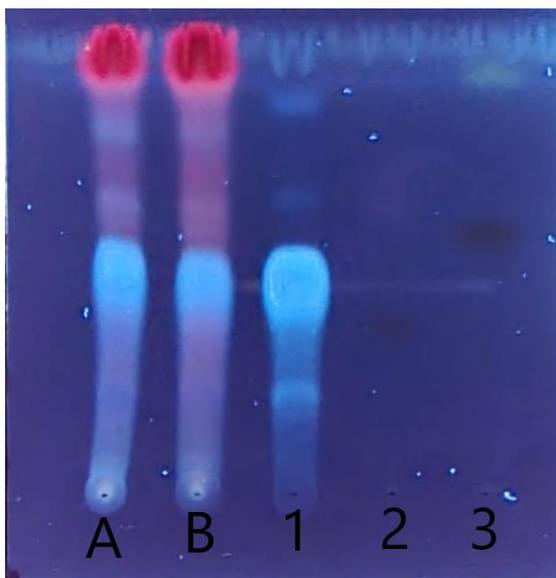


Figura 4 - Cromatografia de camada delgada dos extratos de *Morus nigra*. Eluente: Acetato de Etila, Álcool Metílico, Água, Ácido Fórmico (20:2,7:2,0:0,2). Revelador: NP-PEG. (A). Extrato etanólico A; (B) Extrato etanólico B; (2) Padrão de rutina; (3) Padrão de isoquercitrina;

## 4.2. Controle de qualidade microbiológico

### 4.2.1. Contagem de número total de microrganismos mesófilos

A contagem de microrganismos mesófilos foi alta para as bactérias mesófilas e na contagem de fungos e leveduras não foi registrado nenhum crescimento. O limite máximo de bactérias mesófilas permitido pela Farmacopeia Brasileira, 6ª edição, é de  $10^5$  UFC/g. No artigo Guizzo et al. (2015), também se avaliou de *Morus nigra* observou-se um crescimento de bactérias mesófilas, mas estava dentro dos limites estabelecidos e a contagem de fungos e leveduras estava dentro dos limites mesmo com o crescimento de 360 UFC/g. O fato de que no presente trabalho não foi registrado presença de fungos e leveduras não indica a ausência deles no material, pois pode existir esporos inativos.

No meio *Sabouraud*, foi possível observar crescimento de colônias de aspecto visco e não foi possível observar crescimento de fungos durante o tempo de 7 dias (Figura 6). A contagem de colônia foi de  $87 \times 10^8$  UFC/g para a diluição de 1:1.000.000.

No meio Caseína-soja foi possível ver o crescimento de colônia de aspecto semelhante ao encontrado no meio anterior. A contagem de colônia em diluição 1:1.000.000 foi de  $44 \times 10^8$  UFC/g (Figura 7).



Figura 5 - Crescimentos de microrganismos mesófilos em folhas pulverizadas de *Morus nigra* em meio ágar *Sabouraud* após 7 dias a 25 °C.

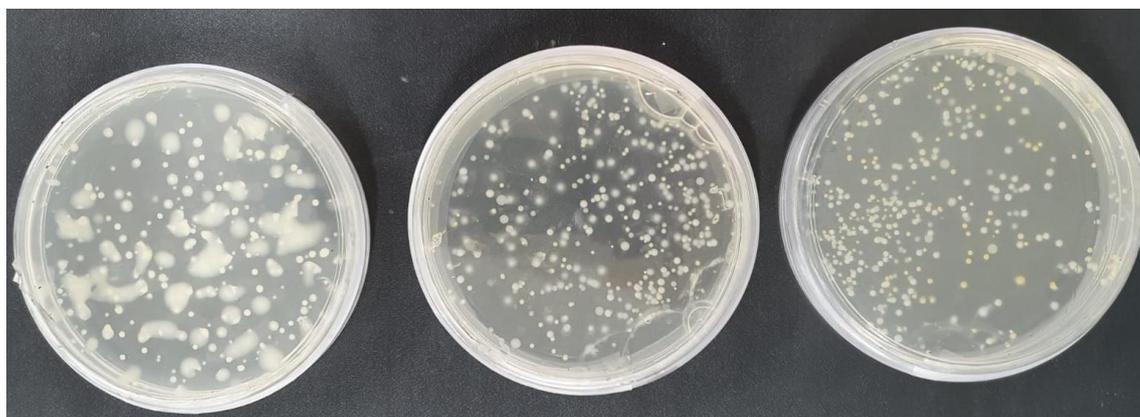


Figura 6 - Crescimentos de microrganismos mesófilos em folhas pulverizadas de *Morus nigra* em meio ágar caseína-soja após 7 dias a 32 °C.

#### 4.2.2. Pesquisa de *E. coli*

O resultado encontrado foi a provável presença de *E. coli* no meio ágar *MacConkey* (Figura 7), que seriam as colônias mais avermelhadas, e é possível ver o crescimento de outras células (Figura 8). Entretanto, não foram feitos testes de identificação microbiana. Então, não é possível confirmar que se trata de colônias de *Escherichia coli*, mas é possível notar que nas placas 1:1.000 houve crescimento de colônias vermelhas, que é um indicativo de *E. coli* (Figura 8).

No artigo de Souza et al. (2006), o autor alega uma diminuição na quantitativa para os patógenos após o uso da solução extrativa e no produto seco por aspersão, ainda

mais é teorizado que a redução dos coliformes totais foi em razão dos patógenos serem pouco resistentes às altas temperaturas.

A presença de *E. coli* é um importante indicativo de contaminação fecal, e sua identificação alerta sobre a possibilidade da presença de outros patógenos veiculados por fezes humanas ou animais, tais como vírus, outras bactérias patogênicas, cistos de protozoários e ovos de helmintos (14).



Figura 7 - Crescimentos de *E.coli* em folhas pulverizadas de *Morus nigra* em meio ágar *MacConkey*, após 24 horas de incubação do caldo *MacConkey* com as folhas pulverizadas, na diluição 1:10.



Figura 8 - Crescimentos de *E. coli* em folhas pulverizadas de *Morus nigra* em meio ágar *MacConkey*, após 24 horas de incubação do caldo *MacConkey* com folhas pulverizadas, na diluição 1:1.000.

#### **4.2.3. Pesquisa de *Salmonella* spp.**

Após aplicação da metodologia para presença de *Salmonella*, foi visto a ausência de bactéria no meio feito com o diluente: tampão fosfato e caldo caseína-soja. É possível notar

que no meio EMB apresenta de *E. coli* no meio pela tonalidade, pretas-azuladas no centro, com bordas claras para transmitir luz, frequentemente com um brilho metálico verde com luz refletida (Figura 9A) (Figura 10A)(23).

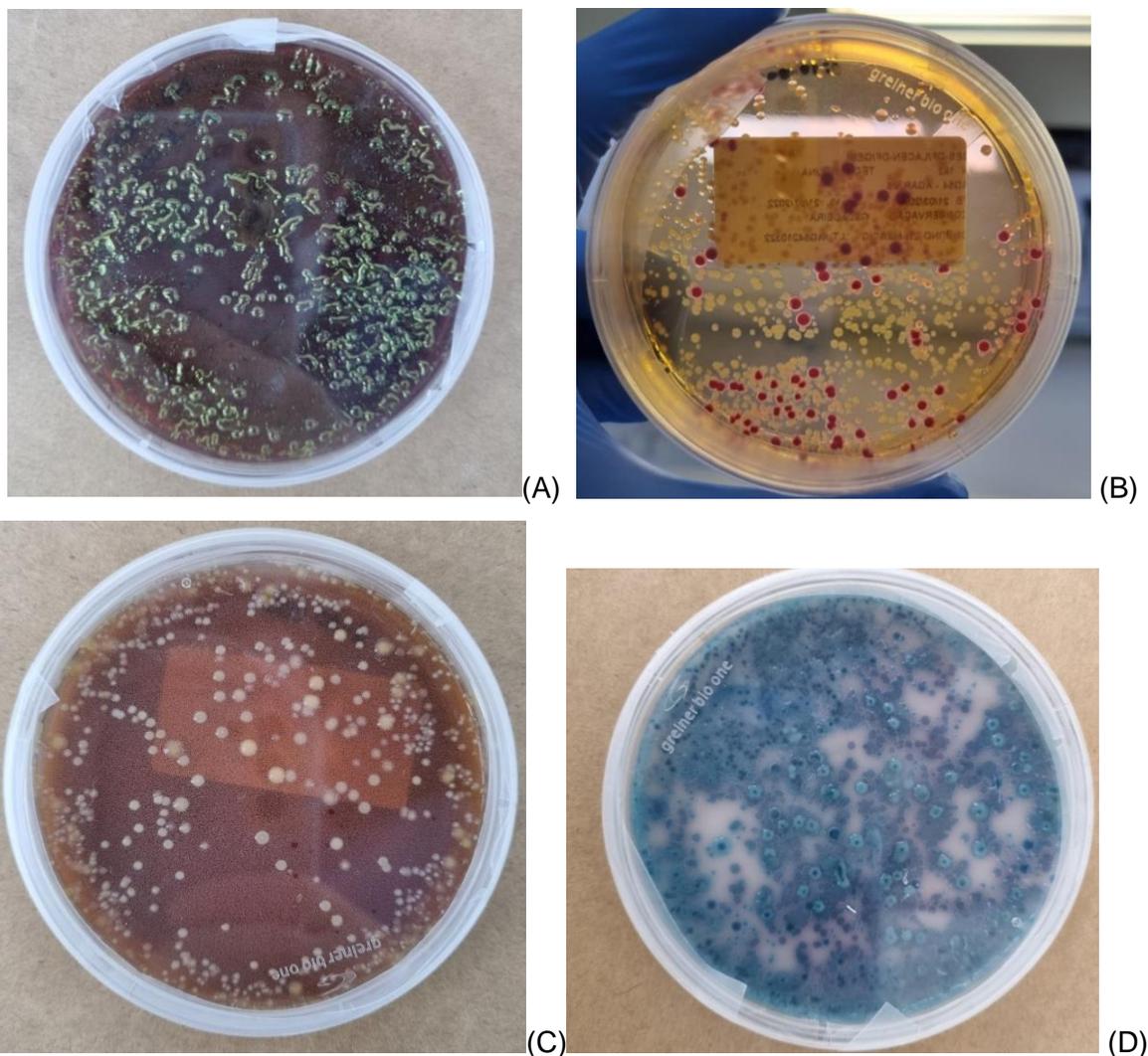


Figura 9 - Folhas pulverizadas nos meios para identificação de *Salmonella*. (A) meio ágar eosina-azul de metileno (EMB); (B) meio *Salmonella Shigella*; (C) meio ágar xilose lisina desoxicolato; (D) meio cromogênico para *Salmonella*.

A utilização de outros meios para *Salmonella* foi para ter certeza sobre as colônias que haviam crescido e identificar a bactéria a partir de meios mais específicos. O primeiro meio (EMB) foi escolhido por ser um meio pouco seletivo para investigação e diferenciação de Enterobactérias fermentadoras e não fermentadoras de lactose em alimentos que foi utilizado para certificar que as colônias eram Enterobactérias. Na sua composição, o meio possui dois reagentes chamados de eosina Y e o azul de metileno que são inibidores de bactérias Gram positivas (Figura 10A). Quando fermentadores de lactose como a *E. coli* são incubados nestes meios, suas colônias ficam pretas-azuladas (Figura 9A), enquanto colônias

de *Salmonella* e *Shigella*, por serem não fermentadores de lactose, são incolores (Figura 10B).

O segundo meio, *Salmonella Shigella* (SS), é um meio mais seletivo, onde os reagentes presentes (sais biliares, verde brilhante e citrato de sódio) inibem os microrganismos gram-positivos (Figura 9B). Logo, os fermentadores de lactose são revelados pela formação de colônias vermelhas. Os microrganismos negativos para a lactose (*Salmonella* e *Shigella*) apresentam colônias com centros pretos (Figura 10D).

O terceiro meio, meio ágar cromogênico para *Salmonella*, é específico para *Salmonella spp.* Neste ágar os substratos são cromogênicos e junto com agentes inibitórios incluídos no meio, muitas bactérias que não são *Salmonella* são inibidas (Figura 9D), dando a coloração magenta para as colônias de *Salmonella spp.* (Figura 10E).

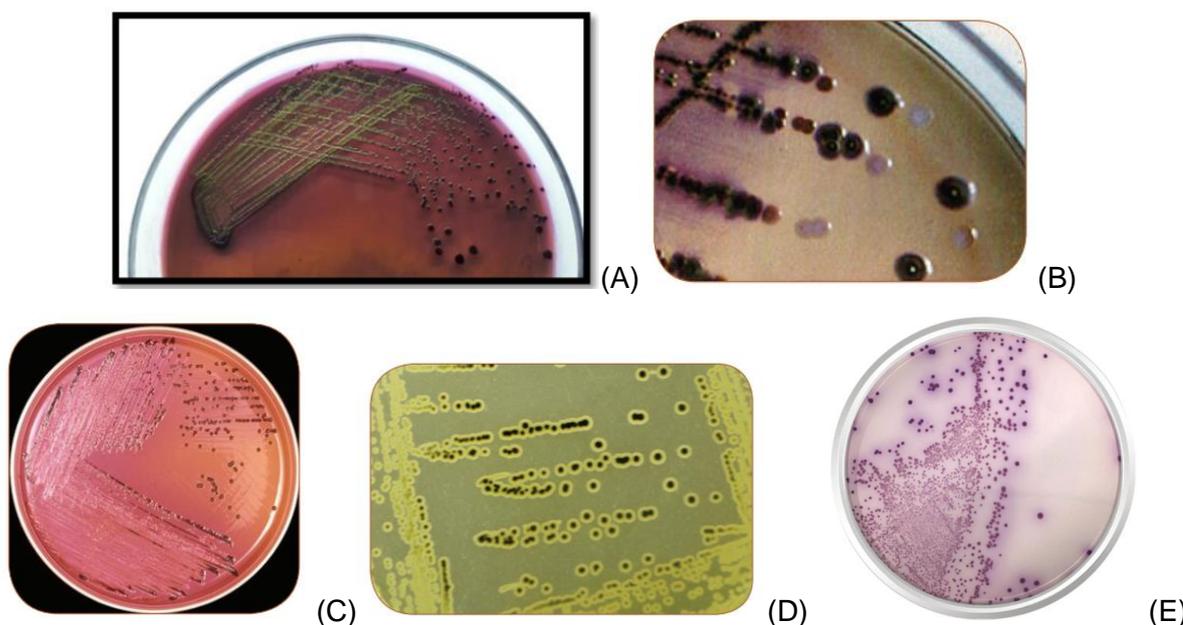


Figura 10 - Placa de Referência. (A) *E. coli* ATCC na placa de Eosina Azul Metileno (EMB); (B) *Salmonella* no meio ágar eosina-azul de metileno EMB; (C) *Salmonella* ATCC. Ágar XLD – morfologia colonial de *Salmonella spp.*; (D) *Salmonella spp.* Ágar *Salmonella-Shigella* (Ágar SS); (E) Meio cromogênico para *Salmonella*; Fonte: DIVYA, P. S. et al (2016) e Ministério da Saúde (2011) e EIGNER et al (2001).

#### 4.2.4. Pesquisa de Bactérias gram-negativas bile tolerantes

Os resultados encontrados no experimento foram que mesmo após a diluição 1:10, 1:100 e 1:1000 houve um crescimento de bactérias nas três diluições, dessa forma o número provável de bactérias por grama foi maior que  $10^3$  como visto na Tabela 2.

Tabela 3 - Tabela dos resultados quantitativos para bactérias gram-negativas bile tolerantes.

Resultados para a quantidade de droga vegetal na diluição			Número provável de bactérias por grama de droga vegetal
1:10	1:100	1:1000	
+	+	+	Mais de $10^3$

Após as 24 horas do meio ágar violeta vermelho neutro é possível ver o crescimento de bactérias (Figura 12).

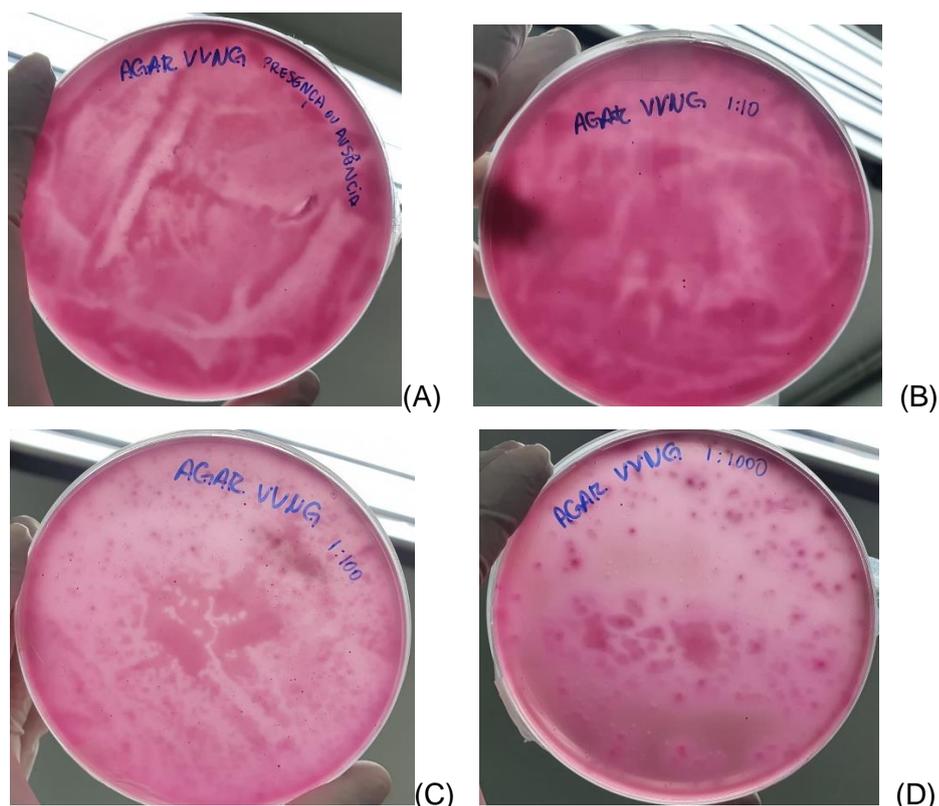


Figura 11 - Meio Ágar violeta vermelho neutro glicose para identificar Bactérias gram-negativas bile tolerante. (A) presença ou ausência de bactérias; (B) diluído 1:10 em tampão fosfato; (C) diluído 1:100 em tampão fosfato; (D) diluído em 1:1000 em tampão fosfato.

A pesquisa por bactérias gram-negativas bile tolerantes é importante, pois os microrganismos da família Enterobacteriaceae são indicadores de baixa higiene,

processamento inadequado e, dependendo, contaminação fecal. Essa família deve ser observada por serem potenciais causadores de doenças de origem alimentar, gerando o risco de infecções do trato intestinal (14).

## 5. CONCLUSÕES

A contaminação observada neste estudo predispõe uma necessidade de processos de redução da carga microbiana. Vários autores descrevem que o processo de extração, quando realizado a altas temperaturas, é uma alternativa para reduzir significativamente o grau de contaminação do material inicial, embora ainda possam ocorrer patologias, uma vez que o processo de extração não é equivalente aos processos de esterilização.

O fato de se encontrar quantidades significativas de colônias de bactérias gram-negativas bile tolerantes e, principalmente, altos níveis de possíveis colônias de *E. coli* junto com microrganismos mesófilos inviabiliza a utilização das folhas para consumo imediato por vias orais e tópicas, com chances de contaminação e aumenta o risco de doenças relacionadas ao trato gastrointestinal, infecções de pele, urinárias e respiratórias.

Sendo assim, os primeiros passos que devem ser tomados são: a identificação mais precisa dos patógenos encontrados através do método da Proteína C reativa (PCR), pois uma identificação mais precisa é um tratamento mais direcionado, e a identificação da planta de *Morus nigra* através de outras cromatografias, CLAE e CG.

Existem algumas possibilidades de tratamento das folhas para diminuir sua carga microbiológica, que seriam: execução adequada das boas práticas de fabricação, armazenagem das amostras em local ideal e acrescentar etapas esterilização com o óxido de etileno ou esterilização por radiação ionizante, ou, ainda, aumentar os graus e/ou o tempo das folhas dentro da estufa.

Desse modo, devem ser realizados mais estudos, a fim de se determinar a contribuição efetiva de cada etapa do processamento da matéria-prima até o produto para assegurar os padrões indicados pela Farmacopeia Brasileira.

## REFERÊNCIAS

1. ROCHA, Tiago G.; GALENDE, Sharize B. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. *Uningá Review Journal*, [S.l.], v. 20, n. 2, nov. 2014. ISSN 2178-2571. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1593>>. Acesso em: 03 de Abril de 2022.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças diarreicas agudas (DDA). Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doencas-diarreicas-agudas-dda-1/doencas-diarreicas-agudas-dda>>. Acesso em: 03 de Abril de 2022.
3. OMS. WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023 2013. Disponível em:<[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf?ua=1)>. Acesso em: 03 de abril de 2022.
4. LIM, Sung H., Chang-Ik, Choi. Pharmacological Properties of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) as A Promising Nutraceutical Resource. *Nutrients.*, v. 11, n. 2. p. 437, 2019, doi:10.3390/nu11020437
5. CRUZ, GL. Dicionário de plantas úteis no Brasil. Rio de Janeiro. Civilização Brasileira. 1979.
6. MORGAN, R. Enciclopédia das ervas e Plantas Medicinais. São Paulo. Hemus Editora, 1982.
7. AGAREZ, FV, Cézio P; Cecília MR. Botânica: Taxonomia, morfologia e reprodução das angiospermas. 2 ed. Rio de Janeiro. Âmbito Cultural. 1994
8. LORENZI, H, Bacher L, Lacerda M, Sartori S. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas. Nova Odessa. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 2006.
9. LORENZI, H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. 2a ed. São Paulo. Instituto Plantarum de Estudos da flora. 2008.
10. GOLÇALVES, EG, Lorenzi H. Morfologia Vegetal: Organografia e Dicionário Ilustrado de Morfologia das Plantas Vasculares. São Paulo. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 416, 2007.
11. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 658, de 30 de março de 2022**. Dispõe adotar as diretrizes gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos do Esquema de Cooperação em Inspeção Farmacêutica (PIC/S), como requisitos mínimos a serem seguidos na fabricação de medicamentos. Acesso em: 09 de Abril de 2022.
12. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 6ª ed., 2019.
13. FREITAS, Marcela M. Obtenção de extratos padronizados em ácido clorogênico, rutina e isoquercitrina a partir das folhas de *Morus nigra* L.: inibição de tirosinase e citotoxicidade.

2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2015.
14. COSSATIS, N. A. Qualidade microbiológica e vigilância sanitária de plantas medicinais brasileiras. 2015. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)– Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.
15. OMS. Organização Mundial de Saúde. Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. Geneva, 2004.
16. BRASIL. Ministério da Saúde. Salmonella (Samonelose). Disponível em: <[https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/salmonella-salmonelose#:~:text=Salmonella%20\(Salmonellose\)%20%C3%A9%20uma%20bact%C3%A9ria,bongori](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/salmonella-salmonelose#:~:text=Salmonella%20(Salmonellose)%20%C3%A9%20uma%20bact%C3%A9ria,bongori)>. Acesso em: 05 de abril de 2022.
17. BRASIL. Ministério da Saúde. MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. 2009. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sctie/daf/plantas-medicinais-e-fitoterapicas/ppnmpf/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-2013-renisus>>.
18. DESTRO, F.; Barolo, M. A review on the modernization of pharmaceutical development and manufacturing - Trends, perspectives, and the role of mathematical modeling. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.L.], p. 121715, 2022.
19. BUTT MS, Nazir A, Sultan MT, Schroen K. *Morus alba* L. nature's functional tonic. Trends Food Sci Technol, 2008.
20. SINGH R., Bagachi A., Semwal A., SatinderKaur, Bharadwaj A. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Morus alba* Linn.: A review. **Journal of Medicinal Plants Research**, 2013.
21. KURNIATI, N. F, Suryani, G.P, Sigit, J.I. Vasodilator Effect of Ethanolic Extract of Mulberry Leaves (*Morus alba* L.) in Rat and Rabbit. *Procedia Chemistry*, 2014.
22. DE SOUZA, T. P., LIONZO, M. I. ZULIAN, P. Avaliação da redução da carga microbiana de droga vegetal através do processamento tecnológico: decocção e secagem por aspersão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. [S.l.], v. 16, n.1, p. 94-98, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000100017>
23. LEVINE, J. Inf. Dis. 22:43. 1981. J. Bact. 45:471. 1943. Vogel, R.A and Moses, R.M. Weld's Method for the Rapid Identification of *Candida albicans* in Clinical Material. **Am. J. Clin. Path.**, v. 28, p.103-106, 1957.
24. 1. GRAY, L.D. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*. In *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American society of microbiology. p. 450-456, 1995.
25. LEIFSON, E. New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 40, p. 581-599, 1935.

26. DIVYA, P. S. et al. Comparative evaluation of EMB agar and hicrome E. coli agar for differentiation of green metallic sheen producing non E. Coli and typical E. Coli colonies from food and environmental samples. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 2863-2870, 2016.
27. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da Salmonella spp. Brasília, DF, 2011.
28. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Cartilha sobre o uso de fitoterápicos e plantas medicinais. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/orientacoes-sobre-o-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais.pdf>>. Acesso em: 29 Abr. 2022.
29. BRASIL. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Folder sobre fitoterápicos. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/folder-sobre-fitoterapicos.pdf>>. Acesso em: 29 Abr. 2022.
30. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância epidemiológica do botulismo / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2006.
31. GALVÃO, M N., Villas Bôas, G. d K., Machado, M. Silva, M. F. O. d, Boscolo, O. H. Etnobotânica aplicada a seleção de plantas medicinais para cultivos agroecológicos em comunidades rurais do Extremo Sul da Bahia, Brasil. Revista Fitos. v.15, n.1, 2021. DOI: [10.32712/2446-4775.2021.1091](https://doi.org/10.32712/2446-4775.2021.1091)
32. SOUZA, F. S. d, MACIEL, C. C. S., Produtos Fitoterápicos e a necessidade de um controle de qualidade microbiológico, Brasil. VEREDAS FAVIP - Revista Eletrônica de Ciências. v.3, n.2, 2010.
33. GUIZZO, P. L., BREDDA, T.C.C., SCARPA, M.V.C, NAVARRO, F.F. Controle de Qualidade e triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas de Morus nigra L. (MORACEAE). Rev. Ciên. Farm. Básica e Apl., v. 36, n. 2, p.259-265, 2015.
34. EIGNER, U. Evaluation of a new chromogenic medium for the isolation and presumptive identification of Salmonella species from stool specimens. European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease. 2001.